

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-501851

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)3月3日

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/49	Z N A		
A 6 1 K 39/21	A D Y	9284-4C	
C 0 7 K 13/00		8517-4H	
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00
		9281-4B	5/ 00
			A
			Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 22 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-501040  
 (86)(22)出願日 平成4年(1992)6月10日  
 (85)翻訳文提出日 平成5年(1993)2月10日  
 (86)国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 4 9 8 0  
 (87)国際公開番号 W O 9 2 / 2 2 6 5 4  
 (87)国際公開日 平成4年(1992)12月23日  
 (31)優先権主張番号 7 1 4 , 1 5 2  
 (32)優先日 1991年6月11日  
 (33)優先権主張国 米国 (U S)

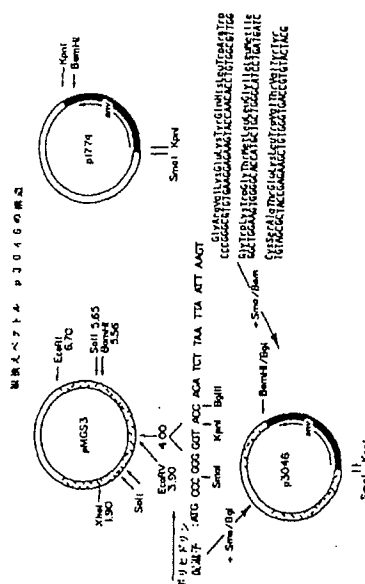
(71)出願人 マイクロジェネシス インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 コネチカット州 06450  
 メリデン リサーチ パークウェイ  
 1000  
 (72)発明者 スミス ゲール ユーゲン  
 アメリカ合衆国 コネチカット州 06606  
 ギルフォード ミッチェル ドライヴ  
 125  
 (74)代理人 弁理士 石黒 健二

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト免疫不全症候ウイルスに対する痘苗(ワクチン)および治療方法

(57)【要約】 (修正有)

ヒト免疫不全ウイルス、および型1(H I V - 1)の包被蛋白を含んだ後天的免疫不全症候群(エイズ)ワクチンは、桿状ウイルス昆虫細胞ベクトル系においてクローニングしたH I V - 1包被遺伝子から生産される。この組換えH I V - 1蛋白は精製され、粒子状にされて磷酸アルミニウム補助剤に吸着される。このように補助剤に吸着された組換えH I V - 1ウイルス包被蛋白形成物(エイズワクチン)は、動物においては高度に免疫活動が示され、H I V - 1ウイルス外被に結合し、体外での実験ではウイルスの感染力を中和する。上述のエイズワクチンは、H I V - 1感染者に対して新たな体液免疫反応および細胞免疫反応を誘発するから、ワクチン療法の一形態として免疫系の破壊を予防ないしは遅延させる上で有用である。



請求の範囲

1. 組換えHIV包被蛋白を感染者に投与することを特徴とするヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
2. 前記組換えHIV包被蛋白は、体重1Kg当たり略1マイクログラムから100マイクログラムを1回の服用として投与されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
3. 前記組換えHIV包被蛋白は、略10μgから略4000μgを1回の服用として投与されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス(HIV)感染者の治療方法。
4. 前記組換えHIV包被蛋白は、略40μgから略1280μgを1回の服用として投与されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
5. 少なくとも3回の服用を投与されることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
6. 少なくとも6回の服用を投与されることを特徴とする特許請求の範囲第4項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
7. 少なくとも各回の服用は30日から60日までの日数を隔てて投与されることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
8. 少なくとも各回の服用は30日から60日までの日数を隔てて投与されることを特徴とする特許請求の範囲第6項に記載のヒト後天的免疫不全症候群感染者の治療方法。
9. HIVに特異的細胞反応、あるいは体液免疫反応の増加を誘引するに十分な量だけHIV包被蛋白を感染者に投与することを特徴とするヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
10. 前記組換え蛋白は、桿状ウイルス昆虫細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
11. 前記組換え蛋白は、桿状ウイルス昆虫細胞発現系から生産されること

21. 前記組換え蛋白は、桿状ウイルス昆虫細胞ベクトルAc3046により発現されるようになっていないことを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
22. 前記組換え蛋白は、少なくとも略2,000,000の分子量を有する粒子に凝集していることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
23. 前記組換え蛋白は、少なくとも略2,000,000の分子量を有する粒子に凝集していることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
24. 前記組換え蛋白は、少なくとも略2,000,000の分子量を有する粒子に凝集していることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
25. 前記組換え蛋白は、補助剤と組み合わせられていることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
26. 前記組換え蛋白は、補助剤と組み合わせられていることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
27. 前記組換え蛋白は、補助剤と組み合わせられていることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
28. 少なくとも略2,000,000の分子量を有する粒子に形成された組換えHIV包被蛋白およびアルミ補助剤を含む組成物を感染者に投与することを特徴とするヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
29. 前記組換え蛋白は、桿状ウイルス昆虫細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
30. 前記組換え蛋白は、組換えgp160、組換えgp120および組換えgp41から選択され、組換えHIV包被蛋白は略145,000の分子量を有し、組換え蛋白は桿状ウイルス昆虫細胞ベクトルAc3046により発現されるようになっていないことを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。

を特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。

12. 前記組換え蛋白は、桿状ウイルス昆虫細胞発現系から生産されることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
13. 前記組換え蛋白は、略145,000の分子量を有していることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
14. 前記組換え蛋白は、略145,000の分子量を有していることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
15. 前記組換え蛋白は、略145,000の分子量を有していることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
16. 前記HIV包被蛋白は、gp160、gp120およびgp41のうちの少なくとも一つであることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
17. 前記HIV包被蛋白は、gp160、gp120およびgp41のうちの少なくとも一つであることを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
18. 前記HIV包被蛋白は、gp160、gp120およびgp41のうちの少なくとも一つであることを特徴とする特許請求の範囲第5項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
19. 前記組換え蛋白は、桿状ウイルス昆虫細胞ベクトルAc3046により発現されるようになっていないことを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
20. 前記組換え蛋白は、桿状ウイルス昆虫細胞ベクトルAc3046により発現されるようになっていないことを特徴とする特許請求の範囲第3項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。

31. 前記組換え蛋白は、gp160の略757個の連続アミノ酸を備え、gp160の略40個の末端連続アミノ酸を実質的に除くことを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス感染者の治療方法。
32. 前記組換え蛋白は、略10μgから略4000μgを1回の服用として投与されることを特徴とする特許請求の範囲第28項に記載のヒト後天的免疫不全ウイルス(HIV)感染者の治療方法。
33. 組換えHIV包被蛋白およびアルミ補助剤を具備し、該組換え蛋白は少なくとも略2,000,000の分子量を有する粒子に形成されたことを特徴とする療法的HIVワクチン組成物。
34. 前記組換えHIV包被蛋白は、一回の服用当たり略10μgから4000μgの量を調整することを特徴とする特許請求の範囲第33項に記載の療法的HIVワクチン組成物。
35. 前記組換え蛋白は、桿状ウイルス昆虫細胞発現系により生産されることを特徴とする特許請求の範囲第34項に記載の療法的HIVワクチン組成物。
36. 前記組換え蛋白は、gp160の略757個の連続アミノ酸を備え、gp160の略40個の末端アミノ酸を実質的に除くことを特徴とする特許請求の範囲第34項に記載の療法的HIVワクチン組成物。

## 明 細 書

ヒト免疫不全症候ウイルスに対する疫苗(ワクチン)および治療方法  
本発明は、1988年2月3日出願の米国特許出願第151,976号の一部継続出願である(現在では特許出願第585,266号)。そして、米国特許出願第151,976号は、1986年10月16日出願の米国特許出願第920,197号の一部継続出願でもある。

## 発明の背景

1型ヒト免疫不全症候ウイルス(HIV-1)は、週及性(レトロ)ウイルスで、免疫系に激しい病状をもって感染を引き起こし、慢性的免疫不全症候群(エイズ)の病原体である(バーレ シノシ等(Barre-Sinoussi et al.))、サイエンス誌 220:868-871(1983); ポポヴィック等(Popovic et al.))、サイエンス誌 224:479-500(1984)参照)。臨床的なHIV-1の分離は、リンパ節浸潤ウイルス(フェオリノ等(Feorino et al.))、サイエンス誌 225:69-72(1984))やエイズ関連ウイルス(レヴィ等(Levy et al.))、サイエンス誌 225:840-842(1984)。

エイズは疫病となっており、疫苗(ワクチン)の開発が世界保健上の見地から優先的問題となっている。エイズ感染者のかなりの多くは、T-リンパ球の欠乏により免疫機能が徐々に失われている。一定の神経細胞と同様に、T-リンパ球は表面にCD4と称される分子を有している。HIV-1は、ウイルス粒子の表面膜に位置する受容器を介してCD4を認識し、細胞の内部に進入して増殖し、結果として細胞を死滅させる。有効なエイズ疫苗(ワクチン)は、HIV-1の表面膜にくっつく抗体を誘い出してリンパ球や他の敏感な細胞に対する感染を防止する。

疫苗(ワクチン)は、免疫予防手段として健康な人が病原体に感染する前に、投与されるのが一般的である。しかしながら、病状に対する免疫療法として感染後に有効なエイズワクチンを用いることを考慮するものも一種あることである(サーク、J. (Salk J.))、ネイチャー誌、327:473-476(1987))。

合成ペプチドは、エイズワクチンの有力候補に挙げられてきている(ケネディ等、(Kennedy et al.)) (1986))。しかしながら、この方法や物質からは有効なエイズワクチンは製造できなかった。

棒状ウイルス-昆虫細胞ベクトル系を用いて組換えHIV-1包被蛋白を製造することは、この発明の側面であり、本出願とともに出願中であり、譲渡者を共同とする1986年10月16日出願の米国特許出願第920,197号(現在では米国特許出願第585,266号となっている)に開示されている(米国特許出願第151,976号も参照)。

棒状ウイルス系を用いると、HIV-1蛋白や他の蛋白を製造する上で有用であることが判明した。例えば、棒状ウイルスであるオートグラファ カリフォルニカ(Autographa Californica)の核多面体状ウイルス(AcNPV)をベクトルとして用いて、gp160の全長体や、感染したスポドプテラ フルギベルダの細胞(Spodoptera frugiperda 真夜盗虫)内に種々の蛋白質を生成した(Sf9細胞)。なお、出願係属中の特許出願には、さい頭形のgp160の遺伝子(組換え番号 Ac3046)、組換え番号 Ac3046から製造された蛋白や、Ac3046遺伝子製造のための精製技術が開示されている。この精製技術には、レンチル-レクチン(レンズ豆抽出細胞凝集性物質)(lentil lectin)緩和性のクロマトグラフィーやゲル浸透性クロマトグラフィーが含まれている。このようにして精製されたgp160蛋白のうち、凝集させて粒子化したものは、げっ歯類や霊長類に対して有効な免疫原となることが判明した。

理想的なエイズワクチンは、生物学的に純粋であることや非発熱性であることに加えて、数回投与した後感染に対して永久的保護が可能でなければならない。この要件は、産性を弱めたワクチンに対しては当てはまる。死滅した細菌やウイルスその他のものが、分離されると、毒物や蛋白質といったものがワクチンとして用いられるが、これらのものは、抗体反応は弱く、短期間の免疫効果しか有さないことが多い。この欠点を補うには、補助剤と称される追加成分が必要である。この補助剤は、免疫反応を刺激する働きを有する。人間のワクチンに用いられる補助剤に共通するものは、アルミニウム塩(リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム)であり、普通にはアルミ補助剤と称せられる(ボンフォード等

疫苗(ワクチン)の開発にあたっては、HIV-1の包被("env")が最も有力候補であると考えられている(フランシス、ペトリッチアーニ(Francis, Petricciani)、ニューイングランド ジャーナルメディスン、1586-1559(1985); ヴォグトおよびヒルシュ(Vogt, Hirsch)、感染症レビュー誌、8:991-1000(1986); ファウチ(Fauci)、ナショナルアカデミー科学紀要USA、83:9278-9283)。HIV-1の包被蛋白は、分子量160,000のグリコ蛋白(gp160)として最初に合成された。この初期のグリコ蛋白(gp160)は、分子量120,000の外被性グリコ蛋白(gp120)と分子量41,000の膜通過性グリコ蛋白(gp41)とに分離された。これらの包被蛋白は、エイズ患者の抗体に対する主要な目的抗原である(バリン等(Barin et al.))、サイエンス誌 228:1094-1096(1985))。HIV-1 gp120自体は、免疫性を示し、げっ歯類、羊やリーサス鼠やチンパンジーに対しては中性化させる抗体を誘導する能力を備えていた(ロベイ等(Robey et al.))、ナショナルアカデミー科学紀要USA、83:7023-7027(1986))。

感染細胞でのHIV-1 gp120自体の包被蛋白レベルが低いことや、HIV-1感染細胞からエイズ疫苗(ワクチン)を抽出するに伴う危険性があるため、組換えDNA方法が適用され、エイズ疫苗(ワクチン)として使用するHIV-1包被抗原が生成されてきた。組換えDNA方法の技術は、エイズ サブユニット ワクチンを生産するには最も優れた手法である。これは、安全で経済的に免疫原を生産する能力を備えているからである。HIV-1包被蛋白は、遺伝子を変換されたファクシニア ヴィルスの組換えにより行われる(チャクラバティ等(Chakrabarti et al.))、ネイチャー誌、320:535-537(1986); フー等(Hu et al.))、ネイチャー誌、320:537-540(1986); キーニ等(Kieny et al.))、バイオテクノロジー、4:790-795(1986))。この包被蛋白は、バクテリア細胞内で生成され(プットニー等(Putney et al.))、サイエンス誌 234:1392-1395(1986))、哺乳類細胞(ラスキー等(Lasky et al.))、サイエンス誌、23:209-12(1986))や昆虫細胞内で生成される。HIV-1 gp41内のアミノ酸配列から誘導され

(Bowford et al.))、"補助剤"、動物細胞バイオテクノロジー 第2巻:235-250、アカデミック プレス社 ロンドン:1985)。

本発明は、ヒト免疫不全症候ウイルス(HIV)に対する疫苗(ワクチン)および治療方法を提供することが目的であり、感染者および感染可能者に対して組換えHIV包被蛋白を投与することを構成要件としている。好ましい実施例としては、包被蛋白は精製され、集められて、ワクチンとして使用するために補助剤(例としてはアルミ)により処理されている。

## 図面の簡単な説明

本発明の詳細は、添付の図面と共に以下に説明する。

第1図は、E. coli プラズミドpNA2からHIV-1包被遺伝子(env)を分離するに用いるクロニング方法を示す。斜線部分は、HIV-1 DNA配列で、空白部分はクロニングベクトルからの部分を示す。プラズミドp1774における黒色部分は合成されたオリゴヌクレオチド(oligonucleotide)から構成され、プラズミドp1614のSma Iの位置にSma I.....Kpn I片として導入されたものである。この合成オリゴヌクレオチドの配列が示されている。

第2図は、組換えプラズミドベクトル(p3046)を構成するために用いる手法を示し、これは棒状ウイルス生成ベクトル(Ac3046)を構成するために用いられる。プラズミド pMGS3は、4,000で表されるクロニング位置のいずれかに棒状ウイルスAcNPVから生成された配列(斜線部分)を含む。この位置は、Sma IやKpn IやBgl IIに対して特有の内ヌクレアーゼの制限酵素を有する。AcNPV多面体プロモーターは、4,000の位置から5'の方向にある。この配列5'-TAATTAATTAA-3'は、3'の方向にあり、全ての三つの読取り系に転写終了コドン(特定のアミノ酸を作り出す遺伝情報形成するヌクレオチド3個の連続)を有する。プラズミドp1774および合成オリゴヌクレオチド部分の配列は、第1図に示してある。プラズミドp3046は、p1774のHIV-1包被遺伝子の挿入されたSma IとBgl II位置との間の配列を除いてはpMGS3の全てを含んでいる。

第3図は、Ac3046 gp160のコード配列の両側に存在するDNAのヌ

クレオチド配列を示す。+1と+2264との間の3046 env DNA配列は、第4図に示す。

第4a図ないし第4k図は、Ac3046(+1と+2264との間)のenv遺伝子の5'末端における合成オリゴヌクレオチドとともに示すHIV-1 envの実際のDNA配列である。内ヌクレアーゼの制限酵素の位置は、DNA配列の上に示され、前述のアミノ酸配列はDNA配列の下に示されている。各基には左右に番号が付されている。

第5a図ないし第5d図は、Ac3046からのenv遺伝子の配列を熟知のLAV-1からenv遺伝子の配列と比較する図である。LAV-1配列は、上方に示され、Ac3046は下方に示されている。LAV-1配列の下方の線(1)は、Ac3046の配列はこの位置では同一であることを示している。DNA配列の番号は、ワイン-ホブソン等(Wain-Hobson et al.)がLAV-1に対して記載したのと同じのものを採用している(細胞、40:9-17(1985))。

第6図は、ヒトHIV-1抗体陽性血清(上のグラフ)および、gp160(IJ55、KL55)あるいはgp120(AB55、CD55、GH55)により免疫化された動物からのリーサス法の血清(下のグラフ)についてのELISA終点稀釈測定を示す。このELISA終点稀釈測定は、高度に精製されたgp120とgp160蛋白に対して測定される。特別に結合させた抗体は、羊-反ヒトIgG HRP対に対して測定された。本テストにより陽性反応を与える血清の最大稀釈は、測定である。

第7図は、ワクチン化した血清陽性患者についてのgp160ワクチンが誘導する免疫反応を要約した表である。

第8図(AおよびB)は、特殊なHIV包被エピソードに対して直接行われるワクチン誘導免疫反応を示す。

第9図は、ワクチン化した血清陽性患者についてgp160に対するワクチン誘導性T細胞増殖反応を示す。

第10図(A-C)は、ワクチン化に伴うリンパ球増殖反応を示す。

第11図は、反応者および非反応者におけるCD4細胞の経時的変化を示す。

組換えgp120およびgp41蛋白が含まれている。Ac3046は、本発明により発現ベクトルの一例であり、組換え包被蛋白でもある。

#### 例1

アミノ酸1-757に対するHIV-1コード配列を有する桿状ウイルス組換えAc3046の生成

桿状ウイルスベクトルにおける異蛋白発現コード配列は、一方ではポリヒドリン蛋白促進子(Polyhedrin promoter)および上流の配列と同列になっており、他方では桿状ウイルスのコード配列と揃って並んでいる。この配列においては、桿状ウイルスの遺伝子と対応する組換えは、ポリヒドリン蛋白促進子および不活性形遺伝子と並んでいる異物コード配列の転写を起こす。

したがって、HIV包被遺伝子の製造のために、多様な挿入ベクトルが創生されている。挿入ベクトルであるMGS3は、下記に述べるように、ATG転写開始コドンを提供するためのものである。このベクトルに異物配列を挿入するに際しては、転写開始コドンにより生じた転写系が異物配列を全体的に正しく維持される状態で行われる。挿入ベクトルMGS3は、悪疫(plaque)を形成したAcMNPV分離体から得られたDNAのEcoRI制限片クローンから構成されたものである(WT-1)。このMGS3は、下記の構造的特徴を有している。

- (a) 多面的遺伝子のATG開始コドンから上流側に4000bpの配列がある。
- (b) 位置指向形の炭水生成に誘導された高度連鎖子を有し、多面体コドンに対応する位置に存するATG開始コドン、制限位置SmaI、KpnI、BglIIおよび汎用停止コドン断片から成っている。
- (c) 多面体遺伝子の内側であるKpnI制限位置からEcoRIクローンの末端EcoRI制限位置に延びる1700bpの配列がある(第2図参照)。

#### 例2

アミノ酸1-757に対するLAV envコード配列を有する桿状ウイルス組換えの生成

第1図にNA2として示す組換えプラズミドは、pUC18に挿入された全体のHIV-1親和性ウイルスの2.1 kb切片からなる。ヒトの所定の細胞

#### 発明の概要

組換えHIV-1 gp160包被蛋白("rgp160")、とりわけ、鋸酸アルミニウムなどが補助剤に吸着されたときには、エイズワクチンとしては特に有効であることが判明している。この発明の一側面では、組換えクローン3046番に見出されたアミノ酸1-757に関するHIV-1包被遺伝子の蛋白に対するコード配列を有するAcMNPV発現ベクトルを扱う。また他の側面では、昆虫細胞内の組換えHIV-1包被蛋白(および蛋白質自体)の製造に関する。とりわけ、アミノ酸配列1-757(すなわち03046)によりコード化されたrgp160蛋白を取り扱う。

本発明の他の側面では、3046蛋白および、鋸酸アルミニウムを集めるために3046粒子の吸着する組換え桿状ウイルスの遺伝子複製物から組換え包被蛋白の精製および純化することを含んでいる。

本発明は、エイズおよびHIV感染に対する予防、治療用ワクチンおよび、エイズおよびHIV感染に対する予防および治療方法をも含んでいる。

#### 発明の詳細な説明

次の例は、発明を限定するものではない。

組換え桿状アウトグラーファ カリフォルニカ核多面体ウイルス(AcMNPV)は、HIV包被蛋白(組換えAc3046)のさい頭形のHIV-1 gp160コードを含んでおり、このことは出願係属中の特許出願第920,197号(現在では特許出願第585,260号)。組換え桿状ウイルス含有遺伝子を構成するために用いられるクローニングの手順は、先の出願に開示されているし、ここにも文献として組み込まれている。

下記は、Ac3046発現ベクトルを構成するために用いられる遺伝子技術の手順を詳細に記載したものである。ここに使用される物質は、酵素や免疫反応物を含み、市販されているものである。本発明の製法および応用例も記載されている。

集約的には、rgp160として参照される他の組換え包被蛋白は、考慮され、

に感染してからウイルスとなることから、このクローンは、感染性とされている(アダチ等(Adachi et al.)、雑誌ウイルス学、59:284-291(1986))。NA2に含まれる完全な包被遺伝子配列は、HIVのLAV種から誘導されたものである(バーレ シノーシ(Barre-Sinoussi)、1983)。

HIV-1の包被遺伝子は、分離され、下記のように処理される(第1図参照)。この包被遺伝子は、NA2から3846bp EcoRI/SacI制限断片として最初に分離され、EcoRI/SacI制限位置pUC19にクローニングされる。この結果生じたプラズミドは、p708として特定される。

包被遺伝子は、その後2800bp KpnI制限断片として再度分離されて、pUC18のKpnI制限位置にクローニングされる。この結果生じたクローンは、p1614として特定される。

このp1614におけるKpnI制限断片は、HIV包被遺伝子の僅かにさい頭形部分を含んでいるから、N-末端部の121bpに対応する配列は失われている。この失われた部分の遺伝子は、誘導形ペプチド配列を含み、二重螺旋の単量体(oligomer)の挿入により置き換えられている。挿入された単量体は、適宜の多面体遺伝子コドンを用いてLAVアミノ酸配列から創生される。この遺伝子組換え操作を促進するために、ATG開始コドンの代わりに新たなSmaI制限配列が同時に導入される。ATG開始コドンは、桿状ウイルス挿入ベクトルにより供給される。この結果生じたプラズミドは、p1774として特定される。

第2図において、HIV-1包被の様々な領域にコード配列を含むp1774からの制限断片は、クローニングされてMGS挿入ベクトル(例:MGS3)となるから、挿入ベクトルのATG開始コドンは、包被遺伝子のコドンとともに組み込まれている。p1774の構造は、プラズミドベクトルpMGS3のSmaI/BglIIの位置に挿入されたp1774から分離されたSmaI/BamHI制限断片から成っている。このクローンは、gp160のアミノ酸1-757に対する配列コードを有し、MGS3ベクトルにより供給された末端コードを利用している。

#### 例3 組換え桿状ウイルスの創成および選択

HIV-1 env遺伝子組換えプラスミドp3046は、AcMNPV (W T-1) とともに沈澱させた細胞カルシウムであり、非感染状態のスポドプテラフルギベルダ (*Spodoptera frugiperda* 葉巻幼虫) の細胞に加えらる。ついで、仮想上の遺伝子は、相同組換えによりAcMNPV配列子に挿入される。組換えウイルスは、閉塞性陰性感染形態学 (occlusion negative plaque morphology) により同定される。このような感染は、細胞破壊効果を示すが、核の閉塞は起こさない。二回の追加的な感染複製が行われて、純粋な組換えウイルスを得る。組換えウイルスDNAは、これらの制限、混成特性を野生のウイルス形DNAと比較することによりHIV env配列への挿入位置特定のために分析される。

## 例4

組換えからのHIV envの発見  
感染した昆虫細胞内の棒状ウイルス

昆虫細胞内の組換えウイルスからのHIV env配列の発見により、結果的には第1次転写物質が合成される。この第1次転写物質は、組換えベクトルから供給されたコンドンから転写されたアミノ酸からなる。この結果、ポリヒドリン蛋白促進子から発見ベクトル (例: rgp160) 上の転写末端誘導部への下流に存する発見ベクトルのAGT開始コンドンに対する全てのアミノ酸を含む蛋白質が生成される。第1次転写物質であるAc3046は、Arg (位置4) が元のLAVクローンでは位置2のArgであるところの終端位置にてMet-Pro-Gly-Arg-Valと読める。Met-Pro-Glyコンドンはクロニング技術の結果により供給される。

## 例5

gp160挿入子およびDNA両側のヌクレオチド配列  
DNA両側およびgp160挿入子のヌクレオチド配列は、ウイルス形発見ベクトルAc3046 DNAから分離された制限断片により決定される。かかる配列技術は下記の手順による。3.9 kbのEcoRV-BamHI断片は、A

Gly  
ATG CCC GGG CGT GTG AAG GAG AAG TAC CAA CAC CTG TGG CGT TGG  
GCC

これらの結果を元のLAV-1のクローンと比較すると表2が得られる。

表 2

元のLAV-1のクローンにおけるLAV env遺伝子

残存物

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Met	Arg	Val	Lys	Glu	Lys	Tyr	Gln	His	Leu	Trp	Arg	Trp	Gly
ATG	AGA	GTG	AAG	GAG	AAG	TAT	CAG	CAC	TTG	TGG	AGA	TGG	GGG

## 例7

組換えgp160の精製

本発明の一側面においては、Ac3046発見ベクトルにコード化された組換えHIV-1包被蛋白を抽出して精製の製法が用いられている。組換えHIV-1包被蛋白gp160は、Ac160注入後4~5日間でS. フルギベルダ (*S. frugiperda*) の細胞内に生成される。rgp160の精製は、下記の手順で行なわれる。

1. 細胞の洗浄 2. 細胞溶解 3. ゲル浸透クロマトグラフィ 4. レンチルーレクチン (Lentil Lectin; レンズ豆から得られるレクチン) 親和性クロマトグラフィ 5. 透析

本例は、 $2 \times 10^8$  個のAc3046の感染細胞から得られた組換えgp160を精製する方法を記載している。

## 1. 細胞の洗浄

感染細胞は、50 mMのトリス緩衝液 (Tris buffer pH 7.5)、1 mMのEDTAおよび1%のトリトンX-100を含む緩衝液により洗浄される。この緩衝液内で細胞が懸濁され通常の手法により均一化され、5000 rpmにより20分間遠心分離される。この手順を3回繰り返す。

Ac3046ウイルス形DNAの制限的取り込みにより精製される。このAc3046ウイルス形DNAは、ワクチン製造のために用いられた媒介細胞に存在する細胞外ウイルスから創成されたものである。

第2図に示すように、3.9 kbのEcoRV-BamHI断片は、全部のgp160遺伝子、上流の100 bpおよび両側DNAの下流の約1000 bpからなる。このうち、全部のgp160のヌクレオチド遺伝子配列は、上流の100 bpおよび両側DNAの下流の1000 bpを含めて決定されている。

要するに、配列決定の結果、クロニング技術で予想したように仮想上の構造が現れた。gp160の配列は、ワイン-ホブソン等 (1985年) が報告した通りであった。転写開始と思われる位置と終端コンドンとの間に存する2253基の配列により、751アミノ酸コンドンおよび28潜在形N-鎖環型の糖形成位置が予測される。このrgp160算定分子量は、残存する糖分を含めて凡そ145,000である。DNA両側の200基の連続的分析により、第3図、第4図および第5図に示すように、正しい挿入を示していることが分かる。

## 例6

gp160のアミノ酸配列

自動化されたエドマン酸化 (Edman degradation) およびHPLC法を用いて、gp160の最初の15残留部分のN-末端部分のDNA配列から予測されたそれと同一と決定された。N-末端部分のメチオニンは、gp160の蛋白質には存在していない。このことは、AcNPV多面体蛋白質がN-末端部分のメチオニン無しで生成されることの知見と理論的に整合する。結局、実際のgp160 DNAおよびN-末端蛋白質の配列は、AcNPV 3046 DNAおよび精製されたgp160の分析により決められたように、下記に示される (表1)。

表 1

AcNPV 3046発見ベクトルにおけるLAV env遺伝子

残存物

2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Pro	Gly	Arg	Val	Lys	Glu	Lys	Tyr	Gln	His	Leu	Trp	Arg	Trp

## 2. 細胞溶解

感染細胞は、50 mMのトリス緩衝液 (pH 8.0~8.5)、4%デオキシコレート (deoxycholate) および1%ベーターメルカプトエタノール内で衝撃音波法 (sonication) により溶解される。この衝撃音波法は、通常の技術により行われる。衝撃音波法を行った後には、核膜の残存物のみが無傷状態で残り、これらは5000 rpmにより30分間遠心分離により取り除かれる。抽出されたgp160を含む表面浮遊物は、無傷状態の細胞で、光学顕微鏡による観察で確認される。

## 3. ゲル浸透

ゲル浸透の操作は、セファクリル樹脂 (Pharmacia 社製) により充填されたファーマシアの5.0×50 cmガラスカラム内で行われる。全層体積は、およそ1750 mlである。このガラス柱および接合部分を非昇熱性にして浄化するために、少なくとも6リッターで0.1規定の水酸化ナトリウムをガラス柱に24時間流す。このガラスカラムからの流出物は、UV-流量セル、モニターおよびチャート記録器 (pharmacia 社) に接続され、4リッターのゲル浸透緩衝液により平衡化される。未処理のgp160は、ガラス柱に詰められてゲル浸透緩衝液により処理される。このガラスカラムにより、この未処理の混合物が三相の大きなUV吸着成分に分離される。最初のピークは、緩衝液で略500 mlと700 mlの間で現れる。ついで、第2のピークは、略700 mlと1400 mlの間で、第3のピークは略1400 mlと1900 mlの間で現れる。これと同じ現象は、最初のピークが本質的で分子量2,000,000以上を示すことを決定する小形の分析カラムによっても観察される。

このピークは、高分子量の脂質および脂質混合物の析出により半透明状態である。このピークには、感染細胞から抽出されたgp160の10%から20%が含まれている。明らかに、gp160のこの部分は、自己と複合化され、あるいは他の成分と複合されて高分子量の析出物となっている。

第2の幅広いピークは、gp160の大半が含まれ、分子量が略18,000と200,000との間蛋白質を含んでいる。

第3のピークには、資料中のベーターメルカプトエタノール ( $\beta$ -mercaptoeth

anol) のため、少量の蛋白が含まれている他は、大半がUV吸着である。

UV吸着を記録の結果、第2のピークを最初に検出したときには、ガラスカラムからの流出物は、レンチル- レクチンカラム (lentil lectin column) に直接与えられる。第2のピークがガラスカラムから消えたときには、流出物は、レンチル- レクチン (lentil lectin) カラムから外し、そのまま捨てる。

4. レンチル- レクチン (Lentil Lectin) (レンズ豆から得た細胞凝集性物質) レンチル- レクチン親和性ゲル媒体 (Lentil Lectin-Sepharose 4B) は、薬局から大量に購入される。レンチル- レクチンは、セファデックス (クロマトグラフィ用球状粒子) (Sephadex) で親和性クロマトグラフィにより純度98%以上に分離される。ついで、シアニ化尿素を用いてセファローズ 4B (Sephacrose 4B) に結合させることにより固定される。この母液は、ゲル1mlに対して略2mgのレンチル- レクチン (ligandとして) を含んでいる。レンチル- レクチンカラムは、5.0cm×30cmのガラスカラム (Pharmacia 社) で、125mlのレンチル- レクチン セファローズ 4B (Lentil Lectin-Sepharose 4B) ゲル (高い分子量を有する物質を低分子化するための濾過媒体) を含んでいる。この母液は、完全に洗浄後に再び利用され、仕入れ先から指示された手法により再生産される。使用しない場合には、ゲルは、0.9% NaCl、1mM MnCl<sub>2</sub>、1mM CaCl<sub>2</sub> および0.01%のチメロサル (thimerosal) の溶液を含んだガラスカラム内に貯蔵される。このガラスカラムは、既述したように使用毎に洗浄されて250mlのレンチル- レクチン緩衝液により平衡化される。

未処理のgp160は、既述のようにゲル浸透柱から流出しているときに直接ガラスカラムに移される。未処理のgp160が、このガラスカラムに接続されると、0.1%デオキシコレート (deoxycholate) を含む800mlのレンチル- レクチン緩衝液により洗浄される。このような状況下で、全てのgp160は、ガラスカラムに付着される。0.3Mのα-メチル- マノサイドを含むレンチル- レクチン緩衝液を用いることにより、付着されたグリコ蛋白を溶離させる。これは、280nmの波長域でUVモニターを介して観察される。

#### 5. 透析

##### A. gp160粒子の構成成分

本発明の一面においては、純化工程の間にgp160の抗原は、分子量2,000,000以上の粒子から成っていることが判明した。このgp160の蛋白は、80~90%の単量体 (分子量160,000) と80~90%の多量体 (粒子状) の混合物として細胞から抽出された蛋白である。ゲル浸透工程により、gp160の集合体を取り除く。gp160の純化工程により (ゲル浸透ガラスカラム (column) における第1のピーク)、gp160は他の細胞と複合化、あるいは凝片と複合化している可能性を示唆している。しかしながら、ゲル浸透ガラスカラムにおける第2のピークでgp160の抗原では、略160,000~300,000の分子量を有しているから、単量体もしくは二量体になっていることは支配的である。

gp160の集合体或多量体は、レンチル- レクチン処理の工程で、形成される。デオキシコレートに対して0.2%臨界ミセル濃度 (CMC) であるところの0.5%のデオキシコレート (deoxycholate) 中のレクチンカラムから溶離したか、あるいは0.1%のデオキシコレート (deoxycholate) 中のガラスカラムから溶離したかによって、抗原が凝集形態をとることが決められる。

凝集物の大きさは、高解像度FPLCスパローズ12 (Superose 12) カラム (Pharmacia 社) により計測される。純化されたgp160の代表的試料は、ブルーデキストラン標準液の分子量2,000,000にほぼ等しいか、あるいは若干大となる大きさを持っている。シュバラー等 (Schwallier et al. 1989年) による交換の研究によれば、胚白細胞内で生じたgp160は、同様の3量体であることが判明している。この研究により、HIV感染細胞およびウィルス粒子内のgp160は、3量体であることも分かっている。こうして、未処理のHIV gp160に見られるのと同様に、組換えgp160の粒子も、第3元および第4元構造を呈しているはずである。

通常の第3元の構造は、gp160を正しく包み込むに必要なエピトープの形成にとって重要である。非糖化蛋白は、結着、洗浄工程においてのgp160抗原への付着から取り除かれてレンチル- レクチンカラムに移行するから、gp160の非親水性の蛋白は、分子内結合を形成し始める。濃度が、CMC以上であ

通常の透析手法により、糖およびデオキシコレート (deoxycholates) が取り除かれる。1リットルの感染細胞から得られたgp160の精製は、下記の表3のように要約される。

本発明の他の実施例では、ゲル浸透法に代わって、通常のイオン交換クロマトグラフィ (陰イオン性および陽イオン性) が用いられる。また、手順の順序はあまり重要ではない。例えば、ゲル浸透法あるいはイオン交換クロマトグラフィがレンチル- レクチン浄化手順の後に続いてもよい。本発明によれば、他の反応試薬が用いられてもよい。例えば、組換え蛋白純化に当たっては、デオキシコレート (deoxycholate) の代わりに、他の洗浄剤が利用されてもよい。これらには、Tween 20 (ポリソルベイト Polysorbate 20)、Tween 80、ルブロール (Lubrol) およびトリトン X-100 (Triton X-100) といった非イオン性の洗浄剤が含まれる。

表 3 純化手順の要約

純化手順	全蛋白 (mg)	gp160 蛋白 (mg)	%gp160 の合計	除去された不純物
細胞ペレット	1-2000	20	1-2	培養媒体
1. 2.3 回目の洗浄	250	15	6	血清アルブミン、大部分の核酸、可溶性細胞蛋白
ゲル浸透	120	12	12	脂質、核酸、高モル濃度の析出物
レンチルレクチン	14	10	70	非糖化蛋白
透析法	13	9	70	糖、デオキシコレート (deoxycholate)、過剰のトリス緩衝液

<sup>1</sup> 全蛋白は、280nmの吸収により評価される。

#### 例8

り、抗原が複合体を形成していることから、デオキシコレート (deoxycholate) は、gp160には結合しないであろう。本発明によって精製したことから、この抗原の成分が集合体になることは、この蛋白自体の固有の性質であろう。gp160蛋白の極めて非親水性のN-末端配列部分があることにより、粒子形成上、本蛋白の中性化に寄与し得ると考えられる。精製した後は、gp160複合体は、蛋白質を実質的に失うことなく、2ミクロンのセルロースアセテートフィルタにより凝縮状態に通過される。

##### B. 粒子形成の分析

精製されたgp160粒子の電子顕微鏡による分析結果では、30~100nmの蛋白質状態の球形粒子であることが判明している。

この粒子の存在について追加的な実験によれば、精製されたgp160はゲル浸透法により分析されたものである。略100ミクログラムのgp160がスパローズ12、FPLCゲル浸透HR10/30カラム (Pharmacia 社) に加えられる。このカラムは、最初は蛋白分子量標準液により校正されている。このカラム (column) からの蛋白形成体は、高度に再現性があり、吸着体積は、蛋白標準液の分子量に反比例する。このカラムにより単量体のgp160が多量体形成物から分離され、2×10<sup>4</sup>以上の分子量の球形蛋白を取り除く。このカラムにより処理されると、精製されたほとんど全てのgp160は溶離して容重的にはなくなる。このため、分子量は2×10<sup>4</sup> (2,000,000) 以上となる。

#### 例9

##### A. gp160のアルミへの吸着

免疫的補助剤としての不溶性複合物の効果は、抗原の固体相への吸着の完全性に依存している。本発明の一部においては、アルミの複合体は、gp160アルミ複合体が免疫原としての可能性を減少させないpHであって、gp160を効果的に吸着するようになっていることが判明している。このアルミ複合体 (銅酸アルミニウム) の形成工程で制御対象となる要素は以下の通りである。

1. 抗原のアルミに対する吸着の最適pHは凡そ5.0である。しかしながら、gp160は、pH7.5に対してpH6.5で免疫性を喪失することが分かっ

ているため、アルミは $7.1 \pm 0.1$ のpH範囲で形成される。このpH範囲でもほぼ100%のgp160がアルミに吸着されることが判明している。

2. NaClから発生したイオン力は、比較的 $0.15M$ 以下である。

3. 銅酸ナトリウムに比較して塩化アルミニウムのモル過剰は、表面浮遊物には銅酸イオンが含まれていないことを示すものである。

4. gp160は、新たに形成されたアルミに加えられて結晶成長を阻止し、粒子の大きさを最小限にする。

以上の手順にて200mlのアルミを調整して精製されたgp160に吸着させるので、抗原の最終濃度は下記の通り $40 \mu g/ml$ となる。

#### B. 反応試薬の調整 (200ml全基準液)

下記の溶液を滅菌済みで非発熱性の100mlボトルないしはビーカーを用意する。ついで、塩を溶液1、溶液2および水酸化ナトリウムに混合し、0.2ミクロンのセルロースアセテートフィルターにより濾過して後に、滅菌済みで非発熱性の100mlボトルに採取する。

溶液1	AlCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.895グラム
	NaHAc · 3H <sub>2</sub> O	0.136グラム
	注入のため、40mlの水に溶解して0.2ミクロンフィルターにより濾過 (WFI)	
溶液2	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	1.234グラム
	注入のため、40mlの水に溶解して0.2ミクロンフィルターにより濾過 (WFI)	
溶液3	NaOH	2.0グラム
	注入のため、100mlの水に溶解して0.2ミクロンフィルターにより濾過 (WFI)	
溶液4	トリス (Tris)	1.25グラム
	注入のため、100mlの水に溶解 (WFI)。90mlのWFIに1ml加えて0.5NのHClによりpHを7.5に調整してWFIを足して100mlにする。	

高圧釜により各溶液を30分間処理する。低速撹拌操作。室温に冷却する。

#### C. アルミの形成

1. 溶液1 (アルミニウム-ナトリウム-アセート) を25mlの滅菌済みで使い捨てビレットを用いて基準液用の容器に加える。この際、溶液1の容量に留意しながら、溶液1を撹拌する。

2. 溶液2 (銅酸ナトリウム) を25mlの滅菌済みで使い捨てビレットを用いて基準液用の容器に加える。撹拌を続けながら、析出させる。なお、この際、溶液1の容量に留意する。

3. 3mlの溶液3 (水酸化ナトリウム) を加え、5分間撹拌を続ける。0.5mlの試料を採取してpHを測定する。pHが7.0以下であれば、さらに0.5mlの水酸化ナトリウムを加えて、さらに5分間撹拌を続け、再び試料のpHを測定する。この操作をpHが7.0と7.2の間になるまで継続する。

4. 基準液用の容器 (溶液1+溶液2+溶液3) に加えらるべき全量を決定し、滅菌済みのWFIを足して100mlにする。

5. 1mMトリス pH 7.5の100ml内の純化gp160を8,000マイクログラムを直接基準液用の容器に加える。

6. 20分間撹拌を続け、ついで基準ワクチンを滅菌済み薬瓶内に配合する。

#### 例10

##### アルミ吸着gp160の免疫能力 (将珠Ab反応)

創生された抗原 (ワクチン) の免疫性を決定する一般的な方法は、一定量の抗原を単投与された一群のネズミに対する特異的な抗体反応を測定することである。投与から4週間後に、ネズミからの放血により、特定の抗原に対する血清の抗体レベルを例えばELISAといった標準試験により測定する。ここに特定の抗原とは、通常の動物を免疫化させるのに用いる抗原をいう。また、ELISAは、Enzyme linked immunosorbent assay (酵素結合免疫吸着試験) の略である。

純化されたgp160のネズミに対する免疫性については、補助剤無しでpH6.0およびpH7.5の場合、例9に記載のようにアルミ吸着の場合ならびにフロイント (Freund) の完全補助剤を混合させた場合に分け、下記 (図4) のように要約される。

の実験が行われた。

先ず当日である零日 (0日) には、10匹からなるネズミ群には、0.5 $\mu g$ 、1.0 $\mu g$ あるいは5.0 $\mu g$ のgp160のみの単投与、アルミ吸着gp160の単投与ならびに、フロイントの完全補助 (CFA) 処理gp160の単投与がされた。28日経過後には、ネズミは放血により血清がELISA (稀释: 1:10) を用いてgp160に対する抗体の存在が検査された。

28日目に検査された血清からの結果は以下に示す表5に要約されている。全てのネズミにおいて、50%以上の血清転換率が見られた。すべての投与において、血清転換率の数および平均血清吸着 (ELISA試薬で1:100稀释でのOD<sub>450</sub>) の数は、アルミ吸着gp160の方がgp160のみで免疫化させたネズミよりも大きかった。

この結果は、アルミ補助剤が大幅gp160抗原の免疫能力を向上させることを示している。

表 5 注入後28日経過

	投与量0.5 $\mu g$		投与量1.0 $\mu g$		投与量5.0 $\mu g$	
	平均値		平均値		平均値	
	P/N <sup>4</sup>	OD <sup>5</sup>	P/N	OD	P/N	OD
gp160	9/10	.407	7/10	.699	7/10	.430
gp160(a1u)	9/10	.547	8/10	.797	10/10	1.347
gp160(CFA)	10/10	1.130	10/10	1.967	10/10	1.317

<sup>4</sup>: VaxSyn<sup>TM</sup>のHIV-Iの0.5 $\mu g$ 、1.0 $\mu g$ 、5.0 $\mu g$ の投与量で免疫化28日経過時点での全数 (N) に対する転換ネズミ数 (P) の比

<sup>5</sup>: 1:100の血清稀释でのgp160に対するスポンサーのELISA試薬により測定して、血清転換されたネズミの平均吸着 (OD<sub>450</sub>)

#### 例12

##### 中性化資料

HIV-1中性化試験は、創成した抗体が、培養したヒトのリンパ球細胞にHIV-1ウイルスが感染するのを阻止するかどうかを決定するのに用いる一般的な手法である。gp160で免疫化した動物からの反血清がHIV-1中性化

表 4

群	gp160	中間ELISA	血清転換率		
gp160	補助剤	ロット	OD <sup>2</sup>	%	(P/N) <sup>3</sup>
1 $\mu$ g	無し、pH7.5	8702	0.140	57%	4/6
	無し、pH6.0	8702	0.110	26%	2/7
	アルミ	8702	1.000	90%	9/10
	アルミ	8705	2.285	100%	6/6
	フロイント	8604	1.108	83%	5/6
	フロイント	8702	1.396	100%	7/7
0.1 $\mu$ g	フロイント	8604	0.434	67%	4/6
	アルミ	8705	1.003	67%	4/6

<sup>2</sup>: ネズミは、免疫化後28日で採血され、ゲル純化され、gp160に対してELISA試薬内で1:10の稀释により血清が試験される。市販のELISA試薬 (ジェンテック社のEIA<sup>TM</sup>ELISA) を用いても、未処理のHIV-1蛋白に対して1:400の稀释の血清については、同様の結果が得られた。

<sup>3</sup>: 全試験数 (N) に対する血清転換したネズミの数 (P) に対する比である。

1. 0マイクログラムの単投与のgp160により免疫化されたネズミは、補助剤がなくても表1に示すように、gp160に対する抗体反応を誘発する。しかしながら、もっと有力な抗体反応は、アルミの補助剤を吸着したgp160の1.0マイクログラム投与の場合である。フロイントの完全補助剤混合あるいはアルミにより調整された場合で、gp160の1.0マイクログラム以下の単投与では、免疫処理したネズミのうち血清転換率が50%以上となることが分かる。gp160の抗原は、pH7.5ないしpH6.0での非調整の抗原ほどはネズミにおける免疫能力はないが、低いpH領域では免疫能力が失われる。

#### 例11

##### アルミ吸着gp160の免疫能力 (ELISA 血清研究)

候補ワクチンが免疫反応を誘発する能力を有することは、極めて重要な生物学上の特性である。アルミにより調整したgp160ワクチンが、動物に対して免疫能力を付与し、このアルミ補助剤が免疫能力を増強することを確認するために下記

試験中で試験され、その結果が下記の表6に要約されている。

表 6

動物	分類	免疫原/補助剤	マイクログラム*	中性化滴定 <sup>†</sup>
リーサス	C55	gp120/Alum	16/8/8	1:80-1:160
リーサス	H55	gp120/Alum	16/8/8	1:80-1:160
リーサス	L55	gp160/Alum	16/8/8	≥1:80
ネズミ	Pool 3	gp120/freund's	.25/.25/.25	1:40-1:80
ネズミ	Pool 8	gp160/freund's	.1/.1/.1	1:40-1:80
モルモット (guinea pig)	純粋化IgG	gp160/freund's	10/10/10	1:320

\*: 第1回目、第2回目および第3回目に投与したgp160およびgp120のマイクログラム量を示す。

<sup>†</sup>: 非免疫化動物の血清に晒されたHIV-1感染細胞に比べて50%だけ感染阻止する反血清の最大滴数を示す。

モルモット(guinea pigs)、兎やリーサス猿も、アルミあるいはフロイント(freund's)補助剤を用いてgp160により免疫化された。一般にこれらの動物に対する免疫化は、HIV-1包被蛋白に対して良好な抗体反応を示した。

## 例13

チンパンジーに対する免疫性

遺伝子的に見て、チンパンジーは人間に最も似ている近縁であり、今のところではHIV-1感染の唯一の動物例である。

3匹のチンパンジーにおける安全性/免疫性の実験では、二匹のチンパンジーがアルミ調整ワクチンのgp160の40μgおよび80μgにより免疫化された。これらは、4週間目には、gp160の40μgおよび80μgが増強免疫として投与された。残りの対照用チンパンジーには、1mlの食塩水を投与した。血清試料は、週毎に各チンパンジーから分析し、gp160およびHIV-1ウイルス抗原に対する抗体を調べた。この際には、三つの免疫試料、すなわち純粋化gp160に対してマイクロジェネシス社(MicroGeneSys, Inc.)により開

とは、ここに記載するエイズワクチンに対するマイクロジェネシス社の商標名である。未処理ウイルスの包被蛋白を認識する反-HIV抗体がチンパンジーに生成されているかどうかを確認するために、免疫前の血清および1週ないしは11週目経過の血清を試験した。この試験の際には、ワシントンのシアトル所在のマイクロジェネシス社の特許品である市販のELISA試験具およびLAV-ELISA<sup>TM</sup>試験具により行われた。80μgのgp160を投与されたチンパンジーは、2週間目で1:100の滴度で陽性であり、以後6週目まで抗体レベルが増し続けた。40μgのgp160を投与されたチンパンジーは、6週間目で1:100の滴度で陽性であった。

## 例14

gp120とgp41との間の抗体の分布

ワクチン接種動物のgp160に対する抗体反応が、gp120あるいはgp41若しくはこれら双方にも示されるかどうかを確認することは意義深いことである。これら三種の組換え包被蛋白に対して多様な免疫的手法を用いることにより、HIV-1包被蛋白の様々な領域に対して抗体分布を抽出し定量化が行われた。この免疫的手法としては、放射線免疫析出法(RIP)、免疫蛍光法(IFA)、ウェスタン・ブロット分析(WB)および量的ELISA法などを用いている。

第6図は、異なる三種の組換え抗原に対する免疫活性を要約するものである。異なる三種の組換え抗原とは、[ART] [TAB] (1) gp120-デルタ(分子のC-末端部からは40個のアミノ酸が欠落している、さい頭形組換えHIV-1 gp120); [ART] [TAB] (2) (組換えHIV-1 gp120の全副産品に由来する); [ART] [TAB] (3) gp160をいう。

HIV-1抗体陽性の50名のヒトの血清、ならびにプールされた3名のヒトの血清は、gp160に対しては高度に反応であり、gp120に対しては種々であり、さい頭形gp120に対しては抗体がほとんどないか、あるいは皆無であった。さい頭形gp120は、HIV-1の外被糖蛋白の90%以上を占め、保護に対する決定因子を含んでいるとされている。ヒトのエイズ陽性血清がこの包被

発されたELISA試薬、ウェスタンブロット分析試薬(Western Blot analysis)および市販のHIV-1 ELISA試薬をそれぞれ用いた。これらの分析結果を下記に示す。

A. ELISA (マグサーチ HIV 160 (MGSearch HIV 160))

ELISA試薬は、ELISA試薬およびマグサーチ HIV 160は、gp160に対する免疫吸着剤で、これについては、本出願とともに出願係属中であり、同一譲渡人とする特許出願第920,197号に記載されている(現在では特許出願第585,266号)。なお、マグサーチは、米国、コネチカット州、メリデンに所在するマイクロジェネシス社の商標名である。

免疫化する前で、最初の免疫接種の11週後に採取された血清試料は、1:10から1:100,000に希釈され、ついで点滴(スポット)あたり100μgの純粋化gp160を含むニトロセルロース片により培養した。この場合の終端点希釈滴度は、山羊の反ヒトIgGアルカリ・フォスファターゼ複合物で検出されたように、反gp160抗体に対して陽性と示されたところの最も高い希釈率であった。

対照用動物であるチンパンジー、および免疫接種された免疫前のチンパンジーの血清試料は、陰性であった。80μgを投与されたチンパンジーは、2週間目の1:100の滴度で陽性であり、40μgを投与されたチンパンジーは、4週間目の1:10の滴度で陽性であった。gp160に対する抗体の点滴は、4週目まで続けられ、この時点での終末点希釈滴度は、それぞれ略1:100,000および1:2,000,000になった。双方のチンパンジーにおける抗体滴度は、6~11週目にかけて僅かに減少した。

この種の反応は、人間のB型肝炎ウイルスに対してワクチン接種したチンパンジーに共通して所見される抗体反応と量的にも質的にも類似している。

B. 市販のELISA試験

ワクチン(VaxSyn)により免疫化されたチンパンジーの血清からのウェスタン・ブロット分析、ならびにマグサーチ HIV 160 ELISA (MGSearch HIV 160 ELISA) から明らかのように、チンパンジーは血清転換後、組換えgp160に対して抗体を有するようになっていた。なお、ワクチン(VaxSyn)

蛋白領域に対してほとんど抗体を持っていないという所見は、ウイルス感染に対する免疫反応が十分保護されないことや、通常の実験では、ヒトの陽性血清が低い中性化活性しか示さないことと符合している。

これに対して、gp160あるいは、さい頭形gp120により免疫化したリーサス猿では、さい頭形gp120のHIV-1包被蛋白に強く反応する抗体を有する。ウイルス包被に沿う抗体認識位置の分布の相違、ならびに強に見られる比較的高い力価は、猿の血清が高い中性化力価を有していることを説明している。

ヒトの血清および免疫リーサス猿血清におけるこれら三種の組換え包被抗原の免疫活性の量的評価は、第7図に示されている。gp160により免疫化した動物の血清を含み、試験した全ての猿の血清は、さい頭形gp120抗原(gp120-デルタ)に対して高い滴定抗体を有していた。

この結果により、組換えgp160は、リーサス猿では自然感染中に生ずることの多い抗原反応とは異なる抗体反応を誘発することが判明した。これらは、免疫化した猿に多く認識され、gp160のgp120-デルタ領域にあるエпитープであり、これらは感染中にはヒトの免疫系には見られないものである。これらの新たなエпитープは、HIV-1に対する防護にとって重要であり、HIV感染に対する予防および処置上、組換えgp160の重要な特性となろう。

## 例15

療法的なワクチン投与

30名のHIV血清陽性患者に対する臨床試験が行われ、HIV感染者個々に対してクロニングしたHIV gp160(既述したように、構造的にウイルス系により生成された)のワクチンの効果が決定された。

組換えgp160によるワクチン化により、30名のHIV血清陽性志願者のうち19名の者(63%)が、gp160 HIV特異的体液、細胞的反応において増加の傾向にあった。6回分のワクチン投与を受けた15名の志願者のうち14名(93%)が、全gp160抗体において増加を示した。したがって、組換えHIV蛋白(すなわち、rgp41、rgp120、rgp160およびこれらの混合物)は、HIV感染患者を治療する方策上で、効果的に投与された



いよう。

本発明の実施例上、HIV蛋白の有効量は、下記に示す既知の技術に基づいて定められる。一般的に、このような有効量は、感染患者の体重 (kg) あたり1  $\mu$ gから100  $\mu$ gの範囲内にある。服用のための投与回数についても、既知の方法で決定されよう。好ましくは、本発明の分野における通常の知識を有する者にとってはよく知られているように、非経口的投与、すなわち静脈投与、腹腔内投与、筋肉投与あるいは皮下投与などにより行われる。

#### A. 志願者の選択

HIV感染患者のうち30名の志願者は募集によるものだった。HIV感染初期の段階での血清陽性志願者は、ウォルター・リード (Walter Reed) 段階1あるいは段階2と定義されるが、これらの者は、登録のための有資格者であった。ウォルター・リード (Walter Reed) 段階1あるいは段階2とは、リンパ腫 (lymphadenopathy) が生じても生じなくても、CD4細胞の数3ヶ月経過後で400を下回らないものをいう (レッドフィールド等 (Redfield et al.)、ニューイングランド ジャーナル・オブ・メディシン、314:131-132 (1986))。追加的な志願者基準は、18歳から50歳までの成人に限り、正常な到達血球数測定、末端障害の疾患なし、試験前12ヶ月間にわたってアルコールおよび薬物常習者でないことであった。全患者は、任意抽出法により治療群に組み入れる前に、2ヶ月の基本的評価を受けた。試験中に対処的ウイルス (anti-retroviral) 薬剤あるいは免疫調節性の薬剤投与を受けた者はいなかった。

30名の志願者のうち26名は男子で、4名が女子であった。このうち14名が白人 (コーカシアン)、13名が黒人で3名がスペイン系であった。平均年齢は、29歳であった (18歳から49歳の年齢範囲)。登録資格者のうち8名は、ウォルター・リード (Walter Reed) 段階1であり、他の22名はウォルター・リード段階2にあった。CD4数の基本的平均値は、668であった (388から1639の範囲)。最初診断から研究対象となるまでにかかった平均期間は、24ヶ月であった (3ヶ月から49ヶ月の範囲)。

#### B. ワクチンの製造および免疫化計画

既に説明したように、試験用ワクチンは、株状ウイルス複製組換え蛋白とし

てgp160から得た非感染サブユニット糖蛋白からなっている。免疫性蛋白は、鶏胚細胞から製造され、生物学的に純化され、最終的なワクチン処方のため硫酸アルミニウムに吸着された。

gp160の3つの投与処方が用いられた。すなわち、ミリリットルあたり40  $\mu$ gであり、ミリリットルあたり160  $\mu$ gであり、ミリリットルあたり320  $\mu$ gであった。注入容積は、40  $\mu$ gおよび160  $\mu$ gの両方では1mlであり、640  $\mu$ gの投与ではミリリットルあたり320  $\mu$ gの2mlが用いられた。

30名の志願者5人づつ6群に分かれた。計画Aと計画Bとの二つの免疫化計画が企画された。計画Aでは、ワクチン投与日が0、30および120日に分かれた。計画Bでは、ワクチン投与日が0、30、60、120、150および180日に分かれた。各免疫化計画 (AあるいはB) 内に、下記の表7に示すように、異なる回数のワクチン投与されたのは3つの群であった。全てのワクチンは、筋肉注入により三角筋に投与された。実験継続期間は10ヶ月であった。最初の2ヶ月は、基本評価であり、次の8ヶ月は最初の投与からの補足的評価である。

表 7 免疫化計画

	gp160の投与量 ( $\mu$ g)					
	投与日	0	30	60	120	150 180
計画A						
第1群		40	40		40	
第3群		160	160		160	
第5群		640	640		640	
計画B						
第2群		40	40	40	160	160 160
第4群		160	160	160	640	640 640
第6群		640	640	640	640	640 640

#### C. 安全性および毒性についての評価

差異は生じなかった。

体外での有糸分裂原および抗原特異増殖反応、ならびに人体での遅延形皮膚過敏テスト反応、もしくは量化的C4細胞の減少促進による計測では、免疫系の悪影響の根拠については、知見されなかった。基本平均CD4細胞数は、ワクチン反応者では716個でワクチン無反応者では605個であった。平均CD4細胞数は、実験日から180日、240日では、ワクチン反応者およびワクチン無反応者で、それぞれ714個、561個であった。240日の実験中には、平均CD4細胞数の実質的変化は、ワクチン反応者ではマイナス0.2%であり、ワクチン無反応者では7.3%の減少を見た (第11図参照)。ワクチンにより誘発されるHIV免疫性は、実験の全工程において被験者にCD4細胞の加速的な減少が見られる現象とは関係していなかった。

ワクチン接種の結果、被験者中のHIVウイルス増殖およびウイルス負荷の増加を評価するにあたっては、体内のウイルス活性は、血しょうの定量化、PBMCウイルス培養、PBMC-DNAポリメラーゼ連鎖反応およびp24抗原の血清レベルを測定することにより行われた。このウイルス培養およびDNAポリメラーゼ連鎖反応実験では、実験中変化は観察されなかった。血清p24抗原は被験者から検出されなかった。

#### D. 免疫性の評価

組換えによる製造ウイルス遺伝子gp160、p66、p24ならびにHIV原型の変種MNの全溶解ウイルスの双方を用いて、全HIV蛋白に対する抗体を測定した。トウビン等 (Toubin et al.) によりナショナルアカデミーサイエンス紀要USA 76:4350-4354 (1979) に記載されているように、ドット プロット (dot blot) およびウェスタン プロット法 (Western blot) を利用した。特異的包被エпитープ抗体反応も測定された (第7図参照)。第7図には、エピトープ88 (gp120中のアミノ酸88-98) および448C (gp120中のアミノ酸448-514) が選出された。これは、gp120の当該領域に対する抗体が初期のHIV感染と相関があると報告されているためである。

各志願者には投与後の第0日、第1日、第2日、第3日、第15日および第30日にそれぞれ面会して診察した。これらの各志願者に対しては、発熱の有無、寒気、むかつき、吐き気、関節痛 (関節の痛み)、筋肉痛 (筋肉の痛み)、不快感、じんましん (皮膚の一過性症状)、痰き込み、眩暈あるいは頭痛について問診した。ワクチン注入による投与位置について局所的反応を評価する試験は、紅斑、腫れ、かゆみ、痛み、過敏症、皮膚变色、皮膚荒れ、リンパ腫の局所変化、注入部位の機能変化および注入位置の皮下層形成について行われた。月毎の到達血球数測定、血清の化学変化、凝結面および尿分析についても評価が行われた。

体外での細胞免疫機能が、T細胞-表現型 (全リンパ球、CD4、およびCD8の表現型) により評価された (リックマン等 (Rickman et al.)、臨床免疫学 52:85-95、1989; ビルクス等 (Birk et al.)、後天的免疫不全症候群誌 4:188-196、1991)。有糸分裂原 (アメリカマゴボウおよびコンカナバリンA (Concanavalin A) (タチナタ豆から生成された有糸分裂性レクチン)) および対照抗原 (カンジダ アルビカンス菌および破傷菌毒素) に対するT細胞の増殖的応答も評価された (上述のビルクス等)。対照抗原 (風疹ウイルス、破傷風毒素、カンジダ アルビカンス菌およびトリコフィトン (trichophyton)) に対する遅延性皮膚過敏テストにより、人体内の細胞免疫機能が評価された。

末梢血球単核細胞 (PBMC) および血しょうに関する量化的ウイルス培養については、ブルケ等 (Burke et al.) が後天的免疫不全症候群誌の3:1159-1167、1991で記載された方法で評価された。DNAポリメラーゼ連鎖反応 (ワグス等 (Wages et al.)、医学的ウイルス学誌、33:58-63、1991) および血清p24抗原レベルは、体内のHIVウイルス負荷の経路により評価された。

系統だった毒性の根拠は見られなかったが、局所的な反応活性は被験者対象者の87%に見られた (ワクチン投与群の13名)。局所的な反応活性は、組織硬結、反応過敏、注入位置での一過性皮下層形成があり、局所的な分泌障害の悪化はほとんど知見されなかった。被験者のうち増強的投与を拒んだ者はいなかった。局所的反応の頻度については、最初の免疫時、増強的投与、あるいは投与回数で

エビトープ106 (gp120中のアミノ酸106-121)、241 (gp120中のアミノ酸241-272)、254 (gp120中のアミノ酸254-272)、300 (gp120中のアミノ酸300-340)、308 (gp120中のアミノ酸308-322)、422 (gp120中のアミノ酸422-454) および735 (gp120中のアミノ酸735-752) が選出された。これは、推定上の機能的な重要性から選ばれたものである。エビトープ106および422は、CD4結合に関与している。エビトープ241、254および735は、群-特異的中性化に関与し、エビトープ300および308は、型-特異的中性化に関与している。

エビトープ582 (アミノ酸582-602) は、対照用として選択された。これは、HIVの自然感染において免疫支配領域に属しているからである。研究対象の追加的エビトープには、49 (アミノ酸49-128) および342 (アミノ酸342-405) を含んでいる。

第7図に示すのは、陰影を付した箱印は、HIV包被指向免疫反応における変化を記録したものである。(+)を付した陰影箱印は、第1の体液反応であり、(+)を付した陰影箱印は、第2の体液反応である。また、(-)の符号印は、免疫化前後の特異エビトープに対する抗体陰性を示すものであり、(+)の符号印は、免疫化前後の特異エビトープに対する抗体陽性を示すものである。この場合、量的変化は伴わないものとする。(.) 付きの陰影箱印は、免疫に伴うgp160に対する新T細胞増殖反応を示す。一方、(.) のみの印は、gp160に対する細胞無反応を示し、hbは「高い背景度(high background)」(解釈不能)を示し、ndは「不発生(not done)」を意味する。

中性化活動は、ナラ (奈良) によりネイチャー法 (333:469-470、1988) に記載のように、多様質活性抑制試料において三種の原形質凝集物 (HIV-111B、RFおよびMN) に対して測定された。HIV特異細胞反応は、gp160、p24および標状ウイルス発現系対照蛋白 (上述のビルクス等による方法) を用いて既知のリンパ球増殖試料により測定した。

E. ワクチン反応者とワクチン無反応者

HIV包被特異エビトープに対する細胞および体液免疫反応の双方の再生選択

的增加が一連のワクチン接種と関連があるときには、被験者はワクチン反応者のみに分類された (第7図参照)。ワクチンにより誘導された体液免疫化は、HIV包被特異エビトープに対する血清転換、あるいは包被特異エビトープに対する第2の強化免疫反応として定義される。ワクチンにより誘導された細胞免疫化は、gp160に対する、新たな再生性、ワクチン接種関連増殖的反応の進展として定義される。ワクチン反応者に対するこの定義は、本実験 (例: 感染後免疫化の有用性に関する評価) の科学的目的の見地から、極めて制限的である。体液的反応も細胞増殖的反応も示さない被験者、あるいは体液的反応のみ、細胞増殖的反応のみしか示さない被験者はワクチン無反応者として分類される。

F. ワクチンにより誘導された体液反応者

第7図に示すように、被験者30名のうち19名 (63%) は、gp160特異性反応および細胞免疫反応の双方を示した。これらの被験者19名は、ワクチン反応者として分類された。11名のワクチン無反応者のうち4名は、体液的反応のみか細胞増殖的反応のみしか示さなかった。ワクチン誘導される反応を検出されなかった7名の全員については、3回のみの接種投与しか受けなかった者であった (計画A参照)。HIVポリメラーゼ (p66)、構造的 (p24) 遺伝子物質、あるいは非HIV対照抗原の破壊風菌に対する抗体結合性に関する変化は検出されなかった。いずれの被験者にも、標状ウイルス類似細胞対照蛋白に対する抗体の発生は見られなかった。

包被抗体 (gp160) の増加は、ウイルス全溶解の HIV-MNを用いたウェスタンプロット法により被験者の13名に検出された。この変化は、免疫化計画に関連を持っており、計画Aでは、15名中の3名の被験者 (20%)、他では15名中の10名の被験者 (67%) であった。計画Bでは、包被蛋白に対する抗体の増加をもたらした ( $P = 0.025$ , フィッシャーの二尾端法精密テストによる)。13名全員は、特異包被エビトープに対して血清転換を示した。

翻って、被験者のうち10名は、いかなる特異包被エビトープに対しても血清変換も生ぜず、ウェスタンプロット法によっても包被抗体に対する抗体増加を示さなかった。特異包被エビトープに対して血清変換を生じた残る7名の被験者は、ウェスタンプロット法ではウイルス包被抗体全体の変化は生じな

った。どの被験者にも、非包被HIV蛋白に対する抗体の変化は見られなかった。

計画Bの6回投与の場合のように、15名の被験者のうち14名 (93%) においては、gp160に対する抗体増加を示した。これに対して、計画Aの3回投与の場合では、15名の被験者のうち7名 (47%) だけが、gp160に対する抗体増加を示した ( $P = 0.01$ , フィッシャーの二尾端法テストによる) (第7図参照)。

第8図に示すように、ワクチン接種前に対するワクチン接種後のgp160特異エビトープの発生率は、下記の通りである。エビトープ49では27~70パーセント、エビトープ88では28~52パーセント、エビトープ106では50~87パーセント、エビトープ214では0~14パーセント、エビトープ254では0~13パーセント、エビトープ300では47~77パーセント、エビトープ308では42~69パーセント、エビトープ342では0~27パーセント、エビトープ422では3~10パーセント、エビトープ448Cでは73~87パーセント、エビトープ735では17~33パーセントであった。ワクチンにより誘導された血清転換は、582 (第7図) を除く全ての特異エビトープに見られた。エビトープ241、254あるいは342に対する抗体 (血清転換) は下記の場合だけに検出された。

二次的な免疫反応は、次のエビトープについて検出された。すなわち、88、106、300、448Cおよび582である。エビトープ582に対する抗体発生率は、ワクチン接種前では100%であったが、被験者1名 (3%) のみが二次的免疫反応を示した。

包被エビトープに対するワクチン誘導HIV抗体の経緯は、第7図に示すように多様である。少なくとも一つのエビトープに対する最初の抗体反応 (血清転換) は、20名の被験者に生じた。この内訳については、計画Aでは15名のうち14名であり、計画Bでは15名のうち6名であった ( $P = 0.005$ , フィッシャーの二尾端法テストによる)。計画Aでの被験者においては、血清転換を生じた者は、免疫前にはエビトープに対する抗体を持っていなかった110名のうち15名 (14%) だけであった。計画Aでの被験者においては、血清転換を生じた者は129名のうち60名 (47%) だけであった ( $P < 0.0001$ , フィッシャー

の二尾端法テストによる)。3ないしそれ以上の包被エビトープに対する血清転換は、計画Bに組み入れた9名 (60%) に生じたが、計画Aでは2名 (13%) に生じたのみであった ( $P = 0.02$ , フィッシャーの二尾端法テストによる)。

三種の異なる種類 (HIV-111B、MNおよびRF) に対する血清中性化活性は、ワクチン接種後0日、90日および195日目の7名の被験者に基づいて決定される。5名のワクチン反応者のうち4名は、1ないしそれ以上の分離物に対して強い中性化活性を示した。このワクチン反応者は、ワクチン無反応者に比べて多様質形成を強く抑制する能力があることが知見された。

G. ワクチンにより誘導された細胞反応

細胞免疫反応における変化は、ウィルコクソン階層検算試験 (Wilcoxon rank sum test) を用いて平均ワクチン接種前リンパ球刺激指数 (基本値LSI) と平均ワクチン接種後リンパ球刺激指数 (LSI) との比較に基づいている。

被験者30名のうち21名 (70%) は、gp160免疫化後に対して新たなT細胞増殖反応を起こしていた (第7図参照)。

第9図は、典型的ワクチン反応者におけるgp160、p24および標状ウイルス対照蛋白に対する増殖的反応を示す。被験者全員において、gp160による増殖は促進され、平均ワクチン接種前リンパ球刺激指数 (基本値LSI) の3からLSIの10にまで引上げられていた (下記の最終免疫化に就いて4値の平均を算出)。これに対して、HIVp24あるいは対照標状ウイルス蛋白に対する増殖的反応については変化は見られなかった。

被験者全員、ワクチン反応により群別に分類された被験者、ならびに免疫化計画により群分類された被験者において、ワクチンに誘導される平均LSI値の変化は、それぞれ第10図に示されている。

gp160に対する増殖的反応は、ワクチン反応者とワクチン無反応者とは有意の差があった ( $< 0.001$ , ウィルコクソン法、二尾端法テスト)。計画B (6回投与) において誘導されるgp160に対する増殖的反応は、計画A (3回投与) において誘導されるgp160に対する増殖的反応よりも大きかった ( $< 0.1$ , ウィルコクソン法、二尾端法テスト)。

21名の被験者のうち19名は、gp160に対して増殖的反応を生じ、さら

に体液的反応を示した（ワクチン反応者）。g p 1 6 0に対する最大平均リンパ球指数（L S 1）は、被験者全員において見られ、5 0、1を記録した。しかしながら、各ワクチン反応者の反応については、第7図に示すようにL S 1の頂上値が3から1 7 1の範囲に亘っている如く様々であり、g p 1 6 0に対する細胞反応のワクチンによる大きさや持続が一過性の関係にある如くである（第9図参照）。

#### H. 結果についての議論

本実験では、試料の大きさに限りがあったにも拘らず、数値の要素はワクチンの免疫能力に関係があった。計画Aでは被験者の1 5名中6名（4 0％）に対して計画Bでは被験者の1 5名中1 3名（8 7％）がワクチン反応者であった（ $P=0.02$  フィッシャー法、二尾端法テスト）（第7図参照）。リッターあたり6 0 0よりも多い平均基本値のC D 4数を有する被験者1 6名のうち1 3名（8 1％）は、ワクチン反応者であった。これに対して、リッターあたり6 0 0以下の平均値のC D 4数を有する被験者1 4名では、そのうち6名（4 3％）がワクチン反応者であった（ $P=0.07$  フィッシャー法、二尾端法テスト）。表8に要約したように、リッターあたり6 0 0以下の平均値のC D 4数を有する被験者であっても、多面的な免疫化法により免疫能力が改善することが分かる。例えば、計画Bにおいては被験者6名のうち5名（6回投与）がワクチン反応者であるのに対して、計画Aにおいては3回投与で被験者8名のうち1名だけがワクチン反応者にすぎなかった（ $P=0.03$  フィッシャー法、二尾端法テスト）（表8参照）。

表 8

基本値CD4に基づくGP160 ワクチン免疫反応性および免疫化計画表			
CD4 数	N	# 反応者(%)	# 無反応者(%)
計画A			
>600	7	5 (71%)	2 (29%)
500-600	5	1 (20%)	4 (80%)
<500	3	0 (0%)	3 (100%)
合計	15	6 (40%)	9 (60%)

を与えるであろう。

血清中中性化活動についての体内発生率は現在では未知であるが、5名のワクチン反応者の4名について、個々のエビトープ種（I I I B、R F、M N）に対する強い中性化活動を観察すれば、感染後の免疫化が抗体の機能変化を誘導することを示唆するだろう。試験上のワクチンは、個々のエビトープ種に対して血清中中性化能力を増加させ、群別的に特異的な中性化エビトープを明確にする上で役立つ可能性がある。

H I V包被蛋白に対する増強反応は、自然のH I V感染ではほとんど起こらない。しかしながら、g p 1 6 0により免疫化した後には、特異的T-細胞増殖反応が起こることが、2 1名の被験者（7 0パーセント）において記録された。このような相違が生ずることの理由については明らかではない。一つの可能性としては、ワクチンに特有の包被エビトープに対して新たな増強反応が起こることが指摘できる（ワクチン製造方法、あるいは体内抗原処理の代替の結果として）。もしくは、増強試薬で用いられた蛋白が、自然ウイルスの相同「野生型」包被エビトープに対して初期のT-細胞増殖反応を刺激しないことが考えられる。しかしながら、補足的な刺激ではあるが、ワクチン化がヒトの細胞免疫反応を促進することが判明している。選ばれたワクチン反応者によれば、免疫強化の後にH I V-I I I B特異的細胞毒素T-細胞反応を示した。

H I V感染者におけるワクチン反応性を支配する要因については、これから明らかにすべきことである。初期感染のH I V感染者であっても、相当の対照手段と比較して種々のワクチンには適度に反応する。この高い反応性は、初期のB細胞に抑制不全とT-細胞の機能不全とに関係している。ワクチン免疫反応性は、基本C D 4細胞数に関与しており、このことはヒトの免疫状態はワクチン反応の重要な決定因子であるとの仮説と符合している。しかしながら、特異的T-細胞数の変化範囲内での免疫化計画は、ワクチン反応に影響を及ぼした。計画B（6回投与）の場合は、逆であった。C D 4細胞数が少ない場合には被験者に免疫反応性が低下するが、この低下はワクチン投与回数を上げるにより改善の可能性があった。このことは、さらにワクチン投与回数、養生法、補助剤あるいは処方の改良如何によりヒトの免疫性が改善されることを示唆している。

#### 計画B

>600	9	8 (89%)	1 (11%)
500-600	2	2 (100%)	0 (0%)
<500	4	3 (75%)	1 (25%)
合計	15	13 (87%)	2 (13%)

全合計	30	19 (63%)	11 (37%)
-----	----	----------	----------

ワクチンの療法的利用は、急性狂犬病感染に対する治療法として1 9世紀にバスツールによって紹介された。しかしながら、他の感染に対する処置については、このような方法での研究は広範にはなされていなかった。A型およびB型肝炎感染に対する処置のように、ウイルス特異的免疫の事後的感染緩和についての処置例は種々あるものの、確定もしくは慢性ウイルス感染に対しては、免疫法の有効利用により人間に対する系統だった研究はなかった。

本発明では、感染後に積極免疫化によりウイルス特異的免疫付与療法を提供する。とりわけ、H I V遺伝子包被から誘導されたg p 1 6 0に対するワクチンにより、H I V感染初期患者の3 0名中1 9名が、ヒトに対するウイルス特異的体液反応および細胞反応を増加させた。

本研究により、自然感染と感染後免疫化における特異的H I Vエビトープに対する抗体反応の差異が質的および量的の双方から測定できた。このようにして、感染者のワクチン誘導形免疫性についての正確な判定が、被験者の7 0％について系統的に記録された。例えば、2 0名の被験者（1 9名はワクチン反応者、1名はワクチン無反応者）特異的包被エビトープに対して血清転換された。ワクチンのみに関与する血清転換（エビトープ2 4 1、2 5 4および3 4 2）は、1 0名の被験者に発生した。

さらには、このワクチンに対する体液反応の変化は、エビトープ地図により特徴づけられているように、特異的抗体反応の因果関係について見込みのある展望を提供し、自然感染からでは導出されない免疫制御機構を特徴づける特別な機会

H I V感染者に積極的に免疫化する際のH I V特異性ワクチン製品に対する安全性について懸念があるものの、免疫に特異的な毒性を証する根拠はなかった。質的培養、D N Aポリメラーゼ連鎖反応試料、ならびに血清抗体試料によれば、体内でのH I V負荷の増加を見た。優れたH I V再生の体内循環やC D 4細胞の減少率により、とりわけワクチン反応者として分類された被験者の間では有効に影響されて有意の差を見た。ワクチン反応者に対する平均C D 4細胞数の変化は、- 0、2％で、ワクチン無反応者では- 7、3％であった。これら資料は、感染後免疫化の反応性はC D 4細胞数の減少には関与せず、体内のH I V再生低下に関係していることを示唆している。

本研究でのワクチン接種の結果は、相応する年齢、人種群および基本C D 4細胞数における1 0人の感染、不処置のヒトのデータベースと比較された。この比較群において平均C D 4細胞数が8、7％減少することとは、計画Aに組み入れられた被験者では7、2％の減少に相当し、計画Bに組み入れられた被験者では0、6％の減少に相当する。これらの結果からは、超換えH I V包被蛋白による感染後ワクチンは実用的であり、さらには当該ワクチンの感染予防的使用に関しては有望であることを示していることが分かる。



[illegible]

9 1 8

٢١٤

[illegible][illegible]

9 1 2017

1 c

[illegible]

[illegible]



[illegible]







[illegible][illegible][illegible]

45

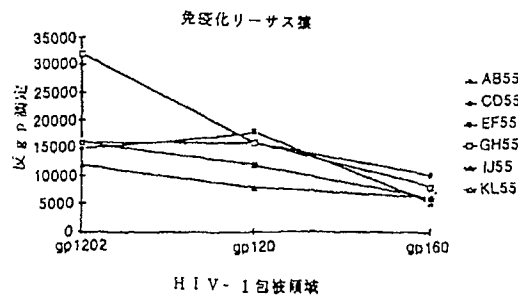
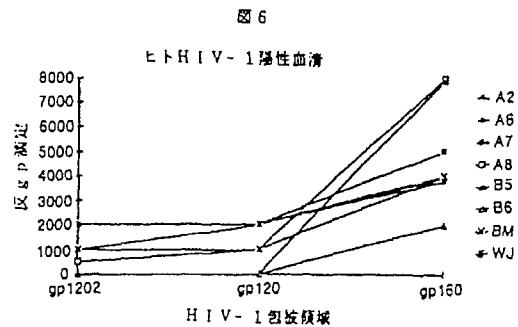


図 7 a

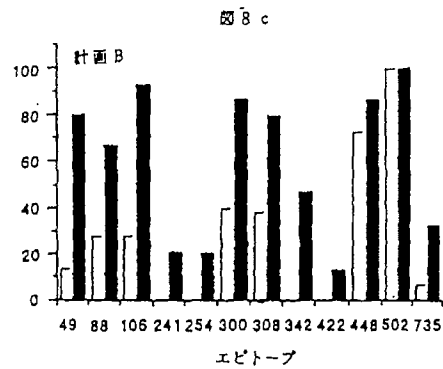
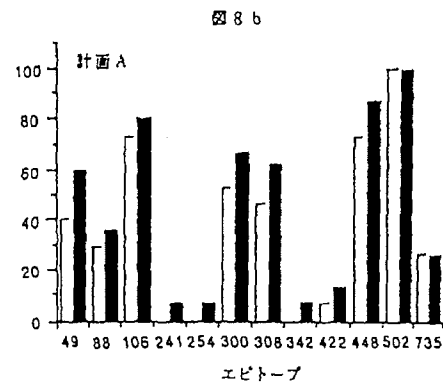
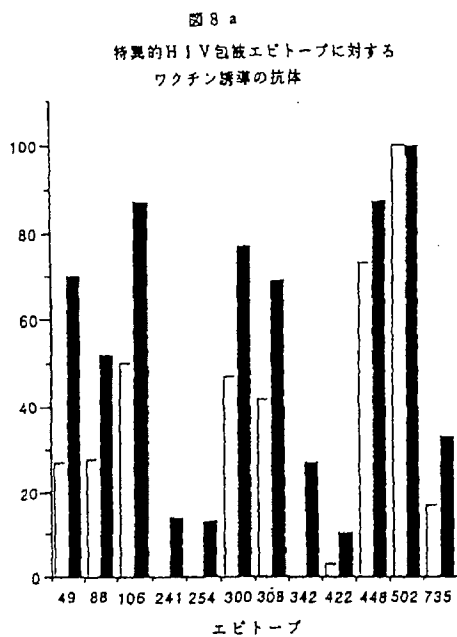
gp160 糖鎖の免疫反応の要約

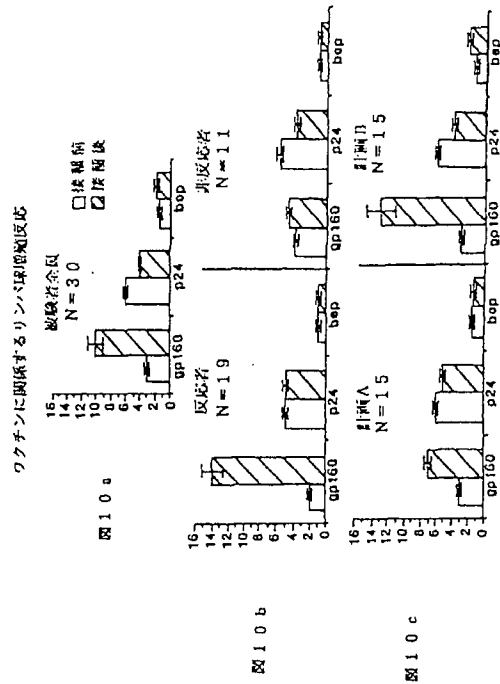
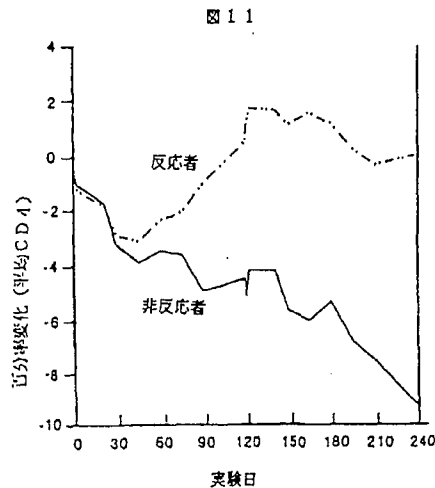
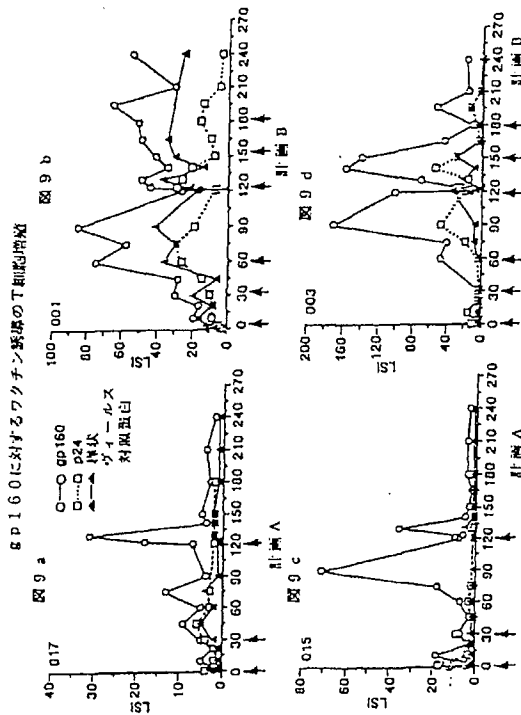
反応性	特異的エпитープに対する抗体反応												T細胞増殖に対する細胞反応	
	49	88	106	241	254	300	308	342	422	448	502	735	合計 gp160	(ピーク1, S1)
反応性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(75)
計画 A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(71)
	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(23)
	17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(50)
	20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(18)
	22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(16)
反応性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(102)
計画 B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)
	33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(11)

図 7 b

gp160 糖鎖の免疫反応の要約

反応性	特異的エпитープに対する抗体反応												T細胞増殖に対する細胞反応	
	49	88	106	241	254	300	308	342	422	448	502	735	合計 gp160	(ピーク1, S1)
反応性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(10)
計画 A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(10)
	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(10)
	12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(10)
	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(10)
	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(10)
	31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(10)
反応性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(12)
計画 B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(12)
	24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	(12)





国際調査報告 PCT/US 92/04980

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classifications are given, indicate only the first one.)

According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classification and IPC:

Int. Cl. 5 C12N15/43; C12N15/86; A61K39/21; C07K13/00

II. FIELD OF SEARCH

Maximum Extent of Search?

Classification System: International Classification

Int. Cl. 5: C07K; C12N

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT?

Category	Number of Document, Title, Author, Date, etc.	Relevance to Claim No.
X	EP A. 0 327 180 (MICROGENESIS INC.) 9 August 1993 see the whole document	1-36

IV. OBSERVATION

Date of the Annual Completion of the International Search: 30 SEPTEMBER 1992

Signature of Authorised Officer: CHAMONNET F. J.

特表平6-501851 (22)

国際調査報告

International Application No.  
PCT/US92/04980

Box I: Observations where searches of some way found inadmissible (Continuation of form 1 of first sheet)

This international search report has not been established as a result of search claims under Article 17(2)(c) for the following reasons:

1. ☒ **Claim Not:**  
Reason: Although claims 1 to 32 are directed to a method of treatment of the human body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. ☐ **Claim Not:**  
Reason: They relate to parts of the international application that do not comply with the provisions of the patent law of the country of origin.

3. ☐ **Claim Not:**  
Reason: They are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.1(c).

Box II: Observations where a search of substances is lacking (Continuation of form 2 of first sheet)

This international search report is based on the following information:

1. ☐ As all required additional search fees have been paid by the applicant, the international search report covers all substances claimed.

2. ☐ As all necessary claims could be searched without effort justifying an additional fee, the Authority did not make payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were paid by the applicant, the international search report covers only those claims for which fees have been paid, specifically claim 1(a).

4. ☐ The required additional search fees were paid by the applicant. Consequently, the international search report is complete in the sense that it contains all the claims, it is not limited by the above fee.

Search as Prior Art: ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's present, ☐ The amount accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (Continuation of form sheet 1) (July 1992)

国際調査報告

US 9204980  
SA 61379

This entry lists the prior art documents relating to the present international search report. The numbers are as indicated in the European Patent Office (EPO) file no. The European Patent Office is to be held for those publications which are directly cited for the purpose of information. 30/09/92

Patent Document word in search report	Publication date	Patent Family number(s)	Publication date
EP-A-0327180	09-08-89	AU-A- JP-A- 2855789 2203793	03-08-89 13-08-90

For more details about this entry: see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>3</sup> 識別記号 序内整理番号

C 12 N 5/10

C 12 P 21/02 C 8214-4B

/(C 12 N 5/10

C 12 R 1:91)

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:91)

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CS, FI, HU, JP, KP, KR, LK, MG, MN, MW, NO, PL, RO, RU, SD

(72) 発明者 ボルボヴィッツ フランクリン

アメリカ合衆国 コネチカット州 06511

ニューヘブーン ナンバー18イー ヨーク

ストリート 123